

別紙

論文の内容の要旨

獣医学 専攻
平成 21 年度 博士課程入学
氏名 吉田貢太
指導教員名 西村亮平

論文題目

Studies on the role of epithelial mesenchymal transition in malignancy and its regulatory mechanism in canine mammary gland tumors

(犬乳腺腫瘍における上皮間葉移行と悪性度との関連ならびにその制御機構に関する研究)

犬乳腺腫瘍は雌犬の中で最も発生頻度が高い腫瘍であり、病理組織学的には約半数が悪性と診断される。悪性例の一部は強い局所浸潤や局所再発及び遠隔転移を示し、特に肺転移によって予後は極めて不良となる。このような悪性の形質を示す原因の一つとして、上皮間葉移行 (EMT) が挙げられている。EMT は Hey らによって提唱された上皮細胞が間葉細胞様に性質が変化する現象で、細胞の形態変化、運動能の亢進、上皮・間葉マーカーの変化といった形質変化として捉えられる。人においては EMT と腫瘍の示す悪性形質の関連については多くの研究がなされており、浸潤能の高い低分化型の癌は EMT を誘導する転写因子の発現が高く、高分化型の癌では低いという報告もなされている。

一方、犬の腫瘍における EMT の報告は数少なく、悪性腫瘍における EMT の意義の詳細については不明である。しかし犬においても組織学的に未分化である乳腺腫瘍は、上皮マーカーである E-cadherin の発現が低下している傾向があり、EMT が癌の悪性化に寄与している可能性が考えられる。そこで本研究では犬乳腺腫瘍の悪性化における EMT の

意義を明らかにすることを目的とし、犬乳腺腫瘍自然発症例における悪性度・予後との関連の評価、犬乳腺腫瘍培養細胞を用いての EMT モデルの作成とその制御メカニズムについて検討を行った。

第 1 章では、過去に東京大学動物医療センターで外科手術を受けた犬乳腺腫瘍自然発症症例の臨床検体を用いて、上皮マーカーである ZO-1、E-cadherin、間葉マーカーである vimentin、N-cadherin、fibronectin の発現を調査し、予後や臨床病理学的プロファイルとの関連を統計学的に調査し、EMT の意義を検討した。

110 頭の犬乳腺腫瘍症例から採取した 119 組織サンプルを調査したところ、腫瘍細胞において上皮マーカーである ZO1 と E-cadherin の発現減少は、それぞれ 24 サンプル (20.2%)、21 サンプル (17.6%) で認められた。一方、間葉マーカーである vimentin、N-cadherin、fibronectin の発現は、それぞれ 21 サンプル (17.6%)、11 サンプル (9.2%)、74 サンプル (62.2%) で認められた。これらのうち、ZO1、E-cadherin、vimentin、N-cadherin は悪性と診断されたもので有意に発現の変化がみられた。またこれらのマーカーでは、いずれのマーカー間においても強い相関関係は認められなかった。

さらに予後との関連を評価するため、外科手術後 1 年間以上生存した群と、1 年未満に死亡した群に分け、群間でのマーカー発現の変化を比較検討したところ、単変量解析において E-cadherin と vimentin が 1 年生存の予後指標となり得ることを見出した。またコンベンショナルな予後因子である臨床病期などの諸因子の影響を考慮した多変量解析においても、E-cadherin が独立した予後因子として有用であることが見出された (adjusted odds ratio: 2.3、 $p=0.02$)。

これらの結果から、EMT の指標の一つである上皮間葉マーカーの発現の変化が犬乳腺腫瘍の悪性化においても見られ、EMT が犬乳腺腫瘍の悪性化に何らかの関与があることが示唆された。そこで第 2 章では犬乳腺腫瘍における EMT と悪性化との関連をより詳細に検討するため、犬乳腺腫瘍由来株化培養細胞を用いて EMT 誘導モデルの作成を試みた。

人の細胞を用いた EMT 誘導実験において最もよく用いられる transforming growth factor- β (TGF- β) 刺激により 犬乳腺腫瘍細胞株に対して EMT 誘導を試みたところ、CHMp-13a 株において Smad2 のリン酸化を伴う vimentin の発現が認められたが、これは一過性の変化であった。浸潤能をリアルタイムに評価したところ、こちらもマーカーの変化と同様に、一過性の亢進であり、これらの結果は EMT 誘導モデルとしては限定的と言わざるを得ず、モデルの改良が必要と考えられた。

そこで人乳癌由来細胞において、hepatocyte growth factor (HGF) が TGF- β 誘導性 EMT を増強するという報告に注目し、犬乳腺腫瘍細胞株に TGF- β と HGF を添加したところ、HGF 刺激により CHMm 株において形態学的変化、運動能の亢進、上皮間葉マーカーの変動が認められた。また CTBp 株及び CTBm 株においては EMT 様の変化が部分的に認められ、partial-EMT が生じたと考えられた。HGF による EMT 誘導の報告は TGF- β を用いた報告に比べ少ないが、HGF 単独刺激で細胞の接着能を強力に阻害することも古く

から知られており、HGFのみでも EMT 誘導能を有すると考えられている。今回の研究において HGF 単独で形態変化を含む EMT 関連因子の変化が認められ、HGF は犬乳腺腫瘍に対する誘導因子となり得ると考えられた。

第 3 章では前章において作成した EMT 誘導モデルを用い、HGF 刺激によって EMT が誘導される制御機序に関して詳細な検討を行った。人において EMT 誘導を制御する転写因子がいくつか同定されているが、本研究ではそれらの中から犬ゲノムにおいても高いレベルで配列が保存されている Snail、Slug、ZEB1、ZEB2、Twist に注目し、検討を加えた。これらはアミノ酸配列においても機能ドメインがよく保存されており、犬の細胞内においてもオーソログとして類似した機能を有していると考えられる。リアルタイム PCR によって TGF- β 及び HGF を添加後の発現動態を解析したところ、最も典型的に EMT が誘導された CHMm 株において Twist が誘導されていることが明らかとなった。Twist はその遺伝子結合部位である basic helix-loop-helix ドメインが犬と人で 100%一致しており、犬乳腺腫瘍細胞株で見られた EMT 誘導に Twist が関与している可能性が高いと考えられた。

そこでさらに HGF 誘導性 EMT における Twist の役割を検討するために、RNA 干渉法を用いて Twist のノックダウンを行い、同様に HGF 刺激による反応を観察した。CHMm 株に対し Twist をターゲットとした異なる 2 種類の siRNA を導入した上で、これらに HGF 刺激を行ったところ、犬のトランスクリプトームに存在しない配列として設計されたコントロール siRNA を導入した群では、運動能の亢進とマーカーの変化が観察されたが、Twist siRNA 群ではこれらの変化が認められなかった。このことから、CHMm 株における HGF 誘導性 EMT は、Twist 依存性に誘導されることが分かった。さらに Twist 自体の機能を調べるために、定常状態で高い Twist mRNA を発現している CHMp 株と CNMm 株に対しても Twist のノックダウンを行い、EMT 関連因子の変化について調査したところ、運動能は有意に低下したが、マーカーの変化は認められなかった。Twist は運動能の調節に関して重要な役割を演じていることが示唆された一方で、上皮間葉マーカーの発現調節に関してはその他の調節因子による制御を検討する必要があることが示唆された。

本研究の結果から、犬乳腺腫瘍臨床症例において EMT 様の現象が確認され、その変化は組織学的悪性度や予後との関連が示唆された。犬乳腺腫瘍細胞株を用いた実験では HGF 刺激による EMT 誘導モデルの作成に成功し、さらにそのモデルを用いた研究から Twist がこのモデルにおける EMT 誘導に必須であることが明らかとなった。しかし Twist の機能は犬乳腺腫瘍における EMT 制御機序に必ずしも優勢的に関与しているわけではなく、犬乳腺腫瘍における EMT 制御の全体像の理解には、他の転写因子の機能の解明を含め、さらなる研究が必要であると考えられた。